中华蜜蜂囊状幼虫病毒北京分离株 VP1 蛋白基因序列特征及原核表达

李 薇, 黄家兴, Abebe Jenberie WUBIE, 薛 菲, 国占宝, 周 婷, 徐书法*

(中国农业科学院蜜蜂研究所,农业部授粉昆虫生物学重点实验室,北京 100093)

摘要:【目的】研究中华蜜蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus, CSBV)VP1 蛋白的分子进化特征及遗传多样性。【方法】利用 RT-PCR 方法,克隆了 8 株 CSBV 北京分离株 VP1 蛋白的基因编码区。【结果】序列分析表明,VP1 蛋白基因编码区开放阅读框长 945 bp,编码 315 个氨基酸,推测编码蛋白的相对分子量和等电点分别为 35.42 kDa 和 9.23,具有亲水性和免疫原性。序列同源性分析表明,不同年份 CSBV 北京分离株 VP1 蛋白氨基酸序列间差异较小,仅个别氨基酸存在差异。北京分离株与辽宁分离株及越南分离株 VP1 核苷酸序列一致性达 93%,与印度及韩国分离株 VP1 核苷酸序列一致性达 92%,与英国分离株 VP1 核苷酸序列一致性最低,为 88%。序列分析同时表明,CSBV 北京分离株 VP1 蛋白序列存在特有的序列特征,同其他地区分离株比较,北京分离株 VP1 蛋白序列中存在着氨基酸的插入突变。序列替换率分析表明,亚洲型分离株间序列替换率低于亚洲分离株与欧洲分离株间的替换率。构建原核表达载体 pEASY-E1-*VP1*,经 IPTG 诱导,CSBV VP1 蛋白在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS 菌株中表达。【结论】本研究提示 CSBV 不同分离株基因序列存在变异,结果为进一步研究 CSBV 致病性分化的分子机理奠定了基础。

关键词: 中华蜜蜂; 囊状幼虫病毒; VP1 蛋白; 系统进化; 原核表达

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2014)04-0495-08

Molecular characterization and prokaryotic expression of VP1 gene from Beijing isolates of Chinese sacbrood virus

LI Wei, HUANG Jia-Xing, Abebe Jenberie WUBIE, XUE Fei, GUO Zhan-Bao, ZHOU Ting, XU Shu-Fa* (Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract:【Aim】To understand the molecular evolution characteristics and genetic diversity of VP1 protein of Chinese sacbrood virus (CSBV) in *Apis cerana cerana*.【Methods】Eight cDNA sequences encoding VP1 proteins were cloned by RT-PCR from Beijing isolates of Chinese sacbrood virus.【Results】Sequence analysis results showed that the open reading frame (ORF) of VP1 gene is 945 bp in length, encoding 315 amino acids with the predicted molecular weight of 35.42 kDa and the theoretical isoelectric point of 9.23, and the encoded protein has hydrophilicity and immunogenicity characteristics. Multiple sequence alignment indicated that the VP1 proteins from these CSBV Beijing isolates in different years share high amino acid sequence identity with occasional changes. The VP1 genes from Beijing isolates have high nucleotide sequence identity with those of Liaoning (LN) and Vietnam isolates (93%), India and Korea isolates (92%), while have the lowest nucleotide sequence identity with that of UK isolate (88%). The sequence analysis results also showed that the VP1 gene from Beijing isolates, other than from some isolates in other areas, has a specific amino acid characteristic which includes amino acid insertion. The nucleotide substitution rate among all Asian isolates was less than that between Asian and European isolates. A recombinant plasmid pEASY-E1-*VP1*, containing the coding sequence of VP1 protein, was constructed using pEASY-E1 as a fused expression vector, and VP1 protein was expressed successfully after induced with isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) in BL21(DE3) pLysS strain of *Escherichia coli*.【Conclusion】The results provide the basis for further studying the

基金项目: 国家科技支撑计划课题(2011BAD33B04); 农业部"948"计划项目(2012-Z6); 国家自然科学基金项目(31072093)

作者简介: 李薇, 女, 1988 年生, 北京人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂病理学, E-mail: xiaoei.2005@aliyun.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xushufa@caas.cn

收稿日期 Received: 2013-12-27; 接受日期 Accepted: 2014-03-25

molecular mechanisms of the pathogenicity evolution of CSBV by confirming the existence of mutants in CSBV of different isolates.

Key words: *Apis cerana cerana*; sacbrood virus (SBV); VP1 protein; phylogeny; prokaryotic expression

囊状幼虫病(sacbrood)是由囊状幼虫病毒(sacbrood virus, SBV)引起的一种病毒性疾病,其中感染中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 的 SBV 称为中华蜜蜂囊状幼虫病毒(Chinese sacbrood virus, CSBV)(杨荣鉴等,1988)。囊状幼虫病是中华蜜蜂的一种重要疾病,一旦发病,则会引起幼虫在几天之内发病致死,成蜂抵抗能力严重下降,整个蜂群群势骤减,甚至引起整个蜂场全部蜜蜂溃败(Runckel *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2011; Ai *et al.*, 2011)。蜜蜂囊状幼虫病在我国发病最重,于 1972 年在我国广东省首次暴发,随后囊状幼虫病蔓延至东南亚的许多东方蜜蜂饲养国家。在近 10 年时间里,我国中华蜜蜂蜂群损失近百万群。到目前为止,蜜蜂囊状幼虫病仍然是威胁我国中华蜜蜂饲养及种群发展的重要病害。

近年来,许多学者对 SBV 的蛋白特性及基因组序列特征进行了较为广泛的研究。研究发现,SBV 是一类小核糖核酸病毒(picornavirus),呈二十面体的球型,无囊膜,是直径为 30 nm 的等轴粒子,属于肠道病毒属 *Enlerovirus* (EV) (Bailey *et al.*, 1964;冯建勋等,1999; Xu *et al.*, 2007)。病毒的基因组全长序列由 8 863 个核苷酸组成,为单股正链 RNA,全基因组中包含了一个大的开放阅读框,编码 319.614 kDa 的多肽,此多肽编码病毒的 4 个结构蛋白 VP1,VP2,VP3 和 VP4(Liu *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Freiberg *et al.*, 2012)。目前,对 SBV 的 4 个结构蛋白的功能研究还未见报道。曹兰等(2012)对来自重庆地区的 SBV 分离株的序列特征及遗传特性进行了研究。发现基于 SBV 不同序列片段的 SBV 系统发育分析可以将 SBV 分成亚洲和欧洲两个基因型,分别主要感染东方蜜蜂和西方蜜蜂。

本实验利用 RT-PCR 的方法,对 2010,2011 和 2012 年收集到的 8 株 CSBV 北京分离株的 VP1 蛋白的基因进行了克隆,对该基因进行了同源性及系统进化分析和功能预测并构建了 VP1 蛋白的原核表达载体,获得了 VP1 原核表达蛋白,旨在为今后进一步研究 CSBV 的致病性分化的分子机理奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　病料来源:根据不同年份的发病情况,分别于 2010,2011 和 2012 年,收集了来自中国农业科学院蜜蜂研究所中华蜜蜂饲养场的不同蜂群患病幼虫样本 8 份。2010 年收集的分别为 BJ1 和 BJ2;2011 年收集的分别为 BJ3,BJ4 和 BJ5;2012 年收集的分别为 BJ6,BJ7 和 BJ8。每份样本收集发病幼虫 10 头以上,置于 -80℃保存备用。

1.1.2　菌株与质粒:克隆载体 pMD19-T 购自 TaKaRa 公司,表达载体 pEASY-E1,大肠杆菌 *Escherichia coli* 感受态细胞 *Trans*1-T1、BL21 (DE3) pLysS 菌株均购于全式金公司。

1.1.3　主要试剂:采用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂, Promega 公司的 RNA 反转录试剂盒(Promega 反转录试剂盒 A5000), EasyTaq DNA 聚合酶购自全式金公司,PCR 产物及质粒回收试剂盒购自于中科瑞泰生物科技有限公司。

1.2　引物设计与合成

在 NCBI 中找出 CSBV 的序列辽宁分离珠(LN, GenBank 登录号:HM237361.1),根据病毒 VP1 结构蛋白的开放阅读框设计了特异性扩增 VP1 蛋白基因的引物,VP1-Forward:5′-GGAGGACCAACATCAGCTCTTAAG-3′, VP1-Reverse: 5′-ATCTTCATCTTCTTTAGCACCAG-3′。扩增目的片段长度为 945 bp。上述引物由北京博迈德科技发展有限公司合成。

1.3　中华蜜蜂发病幼虫的总 RNA 提取

根据 Wang 等(2003)方法用 Trizol 试剂提取中华蜜蜂发病幼虫的总 RNA。用琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop ND-2000 对总 RNA 的纯度和浓度进行测定。

1.4　第一链 cDNA 的合成

将不同地区发病样品的总 RNA 稀释到 1 μg/μL, 分别取 1 μL 进行反转录成为 cDNA, 并于 -20℃保存备用。

1.5　RT-PCR 扩增基因

以 8 份北京分离株病样的 cDNA 为模板,使用引物 VP1-Forward 和 VP1-Reverse,加入 Easy Taq (5 U/μL) DNA Polymerase 0.2 μL,正反向引物各 1

μL，10×EasyTaq Buffer 2 μL，2.5 mmol/L dNTPs 4 μL，1 μL cDNA，加水至 20 μL。反应条件为：94℃ 预变性 3 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 90 s，以上 3 步进行 30 个循环；72℃ 延伸 10 min。PCR 产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.6　PCR 产物的克隆与测序

PCR 产物通过琼脂糖凝胶回收纯化后，连接到 pMD19-T 载体上(按 Kit 说明书操作)，然后转化到大肠杆菌 *Trans*1-T1 中，培养 12 h 后挑取白色菌落，置于含有氨苄 50 μg/mL 的 LB 液体培养基中，震荡培养过夜。收集菌液并做菌液 PCR 验证，分别挑取 10 个阳性克隆测序。

1.7　序列分析

应用 DNAMAN 软件将所得到的 8 个北京样本的核酸序列进行分析比对，并从 GenBank 数据库检索并下载目前已有的其他国家地区的病毒序列，比较 CSBV VP1 蛋白基因与西方蜜蜂的囊状幼虫病毒 VP1 蛋白基因的一致性，并应用 MEGA 5.0 进行序列比对，建立系统发育树。应用 SNAP 软件计算囊状幼虫病毒不同分离株同义替换率(synonymous substitution rate，*dS*)、非同义替换率(nonsynonymous substitution rate，*dN*)及其比值(*dS/dN*)；应用 Pepeheel(v6.0.1)软件对 CSBV BJ6 的 VP1 蛋白序列进行了亲水性预测分析；应用 Protean 软件对 CSBV 的 VP1 蛋白序列进行免疫原性分析。

1.8　原核表达载体的构建及 PCR 鉴定

将得到的 PCR 产物用纯化试剂盒纯化回收。加 4 μL PCR 产物，1 μL pEASY-E1 载体，轻轻混合，25℃反应 15 min。将构建好的载体转化到 *Trans*1-T1 感受态细胞中。通过菌落 PCR 方法鉴定阳性重组子，使用引物为 T7 启动子引物和目的基因反向引物(VP1-R)。PCR 反应条件为，94℃ 预变性 10 min；94℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 90 s，以上 3 步进行 30 个循环；72℃ 10 min。通过测序鉴定出正确表达方向的阳性重组子。

1.9　VP1 结构蛋白基因的原核表达

提取序列正确的质粒，并转化到 BL21(DE3) pLysS 中，挑取单克隆，接种于 LB/Amp 培养基中，200 r/min 剧烈振荡培养，至 OD_{600} 达到 0.5～0.6 时，加入梯度浓度的 IPTG 进行诱导表达，5 h 后表达结束收集菌体，提取可溶性蛋白后，用 12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白，并用考马斯亮蓝染色检测蛋白的表达情况。

1.10　原核表达重组蛋白的鉴定

利用 ABI Mass Specmetry 4700 对重组蛋白进行质谱鉴定(北京华大基因公司)，方法参考仪器操作规程。

2　结果

2.1　CSBV 北京株 VP1 蛋白基因序列分析

以北京地区中华蜜蜂发病幼虫的 cDNA 为模板，VP1-Forward 和 VP1-Reverse 为引物进行扩增，电泳回收得到 1 000 bp 左右的片段(图 1)。将回收后的片段与 pMD19-T 载体连接，转化大肠杆菌 *Trans*1-T1 感受态细胞，培养过夜，蓝白斑筛选出阳性重组子，阳性重组子进一步通过菌液 PCR 进行鉴定，确定重组子中含有目的片段，然后进行测序。测序结果表明，北京地区 8 株 CSBV VP1 的开放阅读框为 945 bp。将测序结果在 NCBI 上进行同源搜寻，结果表明所测序列与多种其他地区的此病毒 VP1 序列高度同源。8 个北京分离株分别命名为 CSBV BJ1～CSBV BJ8，并提交 GenBank 后获得登录号分别为 KF960036～F960043。

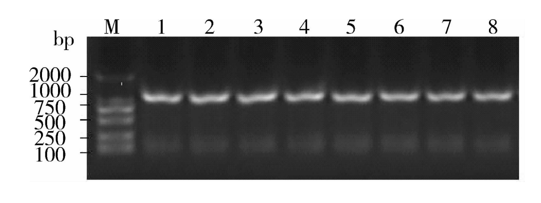


图 1　北京地区 8 个中华蜜蜂囊状幼虫病毒样本的 VP1 基因序列的 PCR 扩增

Fig. 1　PCR amplification of VP1 gene sequences from 8 CSBV samples of Beijing isolates

M：DNA 标准分子量 DNA marker DL2000；1－8：8 个不同样本的 cDNA 作为模板 cDNA from 8 different samples as the template.

2.2　CSBV 北京株 VP1 序列同源性分析及系统发育树的构建

CSBV 北京分离株的 8 份样品与 NCBI 库中病毒分离株间的核酸序列同源性分析表明(图 2)，CSBV 8 个北京分离株之间的一致性最高，均达 97% 以上。北京分离株(BJ6)的 VP1 核酸序列与中国的 LN 分离株和 PPG 分离株以及越南的 SBM2 分离株和 Vietnam 分离株的一致性较高，均达 93%；与印度的 K3A 分离株和 S2 分离株以及韩国的 Korean 分离株和 Kor19 分离株的一致性均为 92%；与中国的 LNSZ 分离株和 HBQHD 分离株的一致性均为 91%；与英国的UK分离株与SBV分离株以及韩国

```
UK       DKPKDISSITIIPKPRLGFPHGKGKSDAVAMRVNPVALTSFQDVGAYPDEPRTTLDIARIWGLRSTFNWGSGDDHGKELF   80
BJ1      --------------------------------------------n--s-------------------------a------   80
BJ2      --------------------------------------------n--s-------------------------a------   80
BJ3      --------------------------------------------n--s-------------------------a------   80
BJ4      --------------------------------------------n--s-------------------------a------   80
BJ5      --------------------------------------------n--s-------------------------a------   80
BJ6      --------------------------------------------n--s-------------------------a------   80
BJ7      --------------------------------------------n--s-------------------------a------   80
BJ8      --------------------------------------------n--s-------------------------a------   80
HBQHD    --------------------------------------------n----------------------------g------   80
LNSZ     --------------------------------------------n----------------------------g------   80
Vietnam  --------------------------------------------n----------------------------g------   80
SBM2     --------------------------------------------n----------------------------g------   80
PPG      --------------------------------------------n----------------------------g------   80
Kor19    --------------------------------------------n----------------------------a------   80
Korean   --------------------------------------------n----------------------------a------   80
K3A      --------------------------------------------n----------------------i-----a------   80
S2       --------------------------------------------n----------------------------a----w-   80
LN       --------------------------------------------n----------------------s-----a------   80
Kor21    -----v------------------------------------e-s----------------------------e------   80
SBV      --------------------------------------------------------------------------------   80

UK       NTVLDPGLRFYDQDYEGQITPMEYVTGLYNFWSGPIELRFDFVSNAFHTGTVIISAEYNRSSTNTDECQSHSTYTKTFHL  160
BJ1      -----s-v------------------------------------------------------------------------  160
BJ2      -----s-v------------------------------------------------------------------------  160
BJ3      -----s-v------------------------------------------------------------------------  160
BJ4      -----s-v------------------------------------------------------------------------  160
BJ5      -----s-v------------------------------------------------------------------------  160
BJ6      -----s-v------------------------------------------------------------------------  160
BJ7      -----s-v------------------------------------------------------------------------  160
BJ8      -----s-v------------------------------------------------------------------------  160
HBQHD    --------------------------------------------------------------------------------  160
LNSZ     --------------------------------------------------------------------------------  160
Vietnam  --------------------------------------------------------------------------------  160
SBM2     --------------------------------------------------------------------------------  160
PPG      --------------------------------------------------------------------------------  160
Kor19    ------c-------------------------------------------------------------------------  160
Korean   ------c-------------------------------------------------------------------------  160
K3A      --------------------------------------------------------------------------------  160
S2       --------------------------------------------------------------------------------  160
LN       --------------------------------------------------------------------------------  160
Kor21    --------------------------------------------------------------------------------  160
SBV      --------------------------------------------------------------------------------  160

UK       GEQKSVHFTVPYIYDTVVRRNTASAYLPVTDYDKVDNVSRAQAMGIRAESKMRVKVRVVNVLRPVASTTSTIEVLVYMRG  240
BJ1      -----------------m----------------a--------t------------------------------------  240
BJ2      -----------------m----------------a--------t------------------------------------  240
BJ3      -----------------m----------------a--------t------------------------s-----------  240
BJ4      -----------------m----------------a--------t------------------------------------  240
BJ5      -----------------m----------------a--------t------------------------------------  240
BJ6      -----------------m----------------a--------t------------------------------------  240
BJ7      -----------------m----------------a--------t------------------------------------  240
BJ8      -----------------m----------------a--------t------------------------------------  240
HBQHD    -----------------m-------------n--a----k---t------------------------------------  240
LNSZ     -----------------m-------------n--a----k---t------------------------------------  240
Vietnam  -----------------m-------------n--a----k---t-v----------------------------------  240
SBM2     -----------------m-------------n--a----k---t-v----------------------------------  240
PPG      -----------------m-------------n--a----k---t-v----------------------------------  240
Kor19    -----------------l-------------n-------k---t------------------------------------  240
Korean   -----------------l-------------n-------k---t------------------------------------  240
K3A      -----------------m----------------a--------t-v----------------------------------  240
S2       -----------------m----------------a--------t-v----------------------------------  240
LN       -----------------m----------------a--------a-v----------------------------------  240
Kor21    --------------------------------------------------------------------------------  240
SBV      --------------------------------------------------------------------------------  240

UK       GKNYALHGLKQSTYWPSNSVVPMDSFPPDGYDPVKPPNRSRRE.ASPNSDGGKGQPEVAVSDNPHRFLPANVSNRWNEYS  319
BJ1      -----------------r----i-------------t--pt-gvg--d-n-----st-----------------------  320
BJ2      -----------------r----i-------------t--pt-gvg--d-n-----st-----------------------  320
BJ3      -----------------r----i-------------t--pt-gvg--d-n-----st-----------------------  320
BJ4      -----------------r----i-------------t--pt-gvg--g-n-----sv-s---------------------  320
BJ5      -----------------r----i-------------t--pt-gvg--g-n-----sv-s---------------------  320
BJ6      -----------------r----i-----------r-t--pt-gvg--g-n-----sv-s---------------------  320
BJ7      -----------------r----i-----------r-t--pt-gvg--g-n-----sv-s---------------------  320
BJ8      -----------------r----i-------------t--pt-gvg--g-n-----sa-s---------------------  320
HBQHD    -----------------k----i-------------sy-l---tg--dn------sv----e------------------  320
LNSZ     -----------------k----i-------------sy-l---tg--dn------sv----e------------------  320
Vietnam  -----------------r----i-------------s--p---mg--d-------sv--a--------------------  320
SBM2     -----------------r----i-------------s--p---mg--d-------sv--a--------------------  320
PPG      -----------------r----i-------------s--p---mg--d-------sv--g--------------------  320
Kor19    -----------------r----i----------------p---.................--------------s-----  303
Korean   -----------------r----i----------------p---.................--------------s-----  303
K3A      -----------------r----i-----------r-t-k----lv-sd-n------v-----------------------  320
S2       -----------------r----i-----------r-t-k----lv-sd-n------v-----------------------  320
LN       -----------------r----i-------------t-..........-nrd-r-sv-...-------------------  307
Kor21    ----------------------i--------------------l--td------e-vsvg--------------------  320
SBV      -------------------------------------------.------------------------------------  319
```

```
UK        SAYLPRVQ   327
BJ1       --------   328
BJ2       --------   328
BJ3       --------   328
BJ4       --------   328
BJ5       --------   328
BJ6       --------   328
BJ7       --------   328
BJ8       --------   328
HBQHD     --------   328
LNSZ      --------   328
Vietnam   --------   328
SBM2      --------   328
PPG       --------   328
Kor19     --------   311
Korean    --------   311
K3A       --------   328
S2        --------   328
LN        -V------   315
Kor21     --------   328
SBV       --------   327
```

图 2　CSBV 的 VP1 氨基酸序列比对分析

Fig. 2　Amino acid sequence alignment of VP1 proteins from CSBVs

方框部分表示北京分离株中特有的氨基酸。Specific amino acids in VP1 from Beijing isolates are boxed. VP1 的来源及 GenBank 登录号 The origin of VP1 proteins and their GenBank accession numbers：LN：中国辽宁分离株 Liaoning isolates（HM237361.1）；UK：英国分离株 English isolates（AF092924.1）；HBQHD：中国河北分离株 Hebei isolates（JX854436.1）；LNSZ：中国辽宁分离株 Liaoning isolates（JX854441.1）；Vietnam：越南分离株 Vietnamese isolates（KC007374.1）；SBM2：越南分离株 Vietnamese isolates（KC007374.1）；PPG：中国分离株 Chinese isolates（AF469603.1）；Kor19：韩国分离株 Korean isolates（JQ390592.1）；Korean：韩国分离株 Korean isolates（HQ322114.1）；K3A：印度分离株 Indian isolates（JX270798.1）；S2：印度分离株 Indian isolates（JX270799.1）；Kor21：韩国分离株 Korean isolates（JQ390591.1）；SBV：英国分离株 English isolates（NC_002066.1）. 下同 The same below.

的 Kor21 分离株的一致性最低，均为 88%。北京分离株间及北京株与其他地区分离株的 VP1 氨基酸序列的同源性分析结果同时表明，北京分离株 8 株样本 VP1 氨基酸序列之间差异并不大，只有个别氨基酸的差别，而北京株与其他地区的分离株氨基酸序列间存在着氨基酸的点突变与插入突变，共有 8 处点突变，分别位于 VP1 蛋白的第 48，74，86，88，281，283，284 和 290 位氨基酸处，与 LN 分离珠比较，存在两处长度为 10 和 3 个氨基酸的插入突变，分别位于北京分离珠 VP1 蛋白基因的第 278 – 287 位和第 298 – 300 位氨基酸处，与韩国的 Korean 分离株和 Kor19 分离株比较，存在一处长度为 17 个氨基酸的插入突变，位于北京分离珠 VP1 蛋白的第 284 – 300 位氨基酸处。

替换率分析得出，CSBV 8 个北京分离株 VP1 蛋白基因之间的替换率差异并不明显；8 个北京分离株 VP1 蛋白基因与所有候选序列间的同义替换水平明显高于非同义替换水平；8 个北京分离株的 *dS* 和 *dN* 的比值与亚洲型分离株中的越南株、印度株、韩国部分分离株（Kor19）及中国其他地区的分离株的 *dS* 和 *dN* 的比值相对于与亚洲型分离株如韩国分离株（Korean 和 Kor21）及欧洲型分离株的 *dS* 和 *dN* 的比值要低（表 1）。

表 1　CSBV 北京分离株 VP1 片段与其他地区分离株间的序列替换率分析

Table 1　Nucleotide substitution rate of VP1 from Beijing isolates of CSBV and other isolates

分离株 Isolates	*dS*	*dN*	*dS*/*dN*
Korean	0.2429 – 0.2629	0.0175 – 0.0189	13.2011 – 15.0384
Kor21	0.4766 – 0.4931	0.0364 – 0.0394	12.1059 – 12.9970
Vietnam	0.1804 – 0.1922	0.0187 – 0.0214	8.4433 – 10.3006
Kor19	0.2495 – 0.2697	0.0275 – 0.0296	8.5592 – 9.0899
SBV	0.4395 – 0.4490	0.0296 – 0.0337	13.0390 – 15.1889
UK	0.4395 – 0.4490	0.0296 – 0.0337	13.0390 – 15.1889
LN	0.2575 – 0.2709	0.0300 – 0.0314	8.2016 – 9.0359
SBM2	0.1804 – 0.1922	0.0187 – 0.0214	8.4433 – 10.3006
PPG	0.2041 – 0.2163	0.0186 – 0.0214	9.5613 – 11.6061
S2	0.2367 – 0.2490	0.0207 – 0.0234	10.1179 – 11.7669
K3A	0.2147 – 0.2266	0.0200 – 0.0227	9.4397 – 11.0381
LNSZ	0.2665 – 0.2798	0.0248 – 0.0275	9.6852 – 11.2926
HBQHD	0.2606 – 0.2738	0.0248 – 0.0275	9.4769 – 11.0577

dS：同义替换率 Synonymous substitution rate；*dN*：非同义替换率 Nonsynonymous substitution rate.

基于 VP1 构建的进化树（图 3）表明，在选定的 21 个囊状幼虫病毒序列中，CSBV 北京分离株的基因序列之间进化关系最近，与辽宁和印度分离株进化关系较近，与越南和韩国的分离株关系稍远，与英国的分离株进化关系最远。

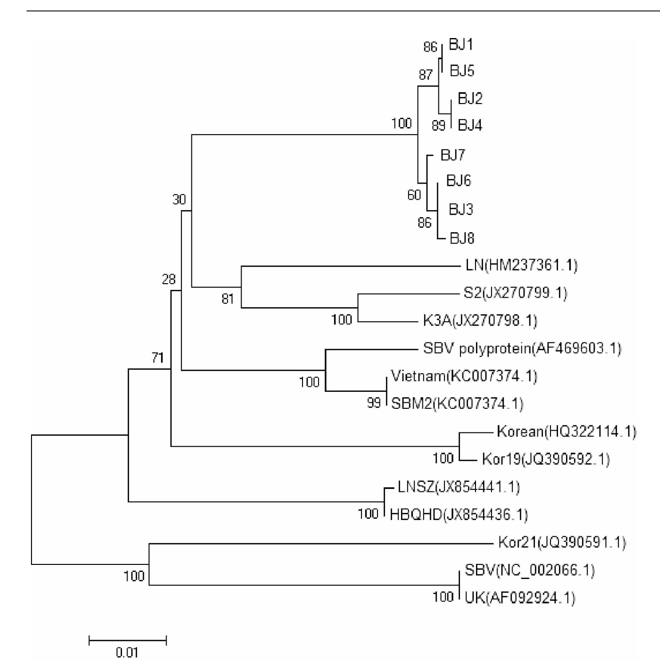


图 3 CSBV 不同分离株 VP1 序列的 NJ 进化分析

Fig. 3 The NJ tree phylogenetic analysis of VP1 from different isolates of CSBV

以 0.01 的遗传距离作为标尺;分支点上的数值为 1 000 次 bootstrap 后的置信度。Genetic distance of 0.01 as the scale bar. Numerals on the node are the bootstrap values of 1 000 replications.

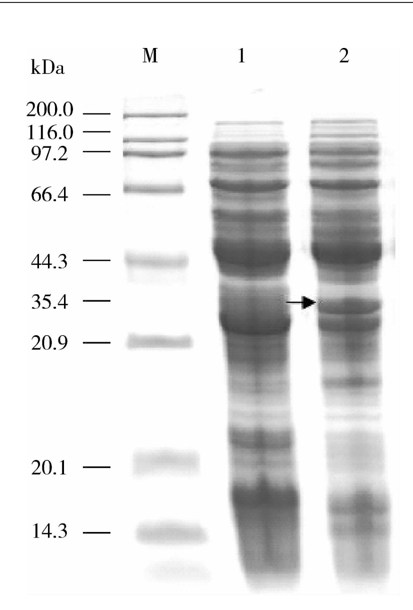


图 4 CSBV BJ6 的 VP1 蛋白原核表达

Fig. 4 Prokaryotic expression of VP1 from CSBV BJ6

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: pEASY-E1 空载体诱导的菌体蛋白 pEASY-E1 induced by IPTG; 2: IPTG 诱导 5 h 的 pEASY-E1-VP1 菌体蛋白 pEASY-E1-VP1 fusion proteins induced by IPTG for 5 h. 黑色箭头示目的蛋白 The black arrows show the pEASY-E1-VP1 fusion proteins.

2.3 CSBV 北京株 VP1 蛋白特性分析

对 CSBV 北京分离株(BJ6, KF960041)VP1 序列编码区分析。分析结果表明,BJ6 序列开放阅读框长 945 bp,编码 315 个氨基酸残基,推测编码蛋白的分子量为 35.42 kDa,等电点为 9.23。

采用 Pepeheel(v6.0.1)软件,对 CSBV BJ6 的 VP1 蛋白序列进行了亲水性预测分析,预测结果表明,VP1 亲水性氨基酸所占比例为 68%,属于亲水性蛋白。经过 Protean 软件预测,VP1 蛋白具有免疫原性。

2.4 CSBV 北京株 VP1 原核表达及重组蛋白的鉴定

将所克隆的北京分离株 BJ6 的 VP1 蛋白基因重组入 pEASY-E1,构建重组表达载体 pEASY-E1-*VP1*,将重组质粒转化入 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 中。经 IPTG 诱导 5 h 表达出 VP1 蛋白。12.5% SDS-PAGE 电泳显示(图 4),在 35 kDa 处出现了特异的融合蛋白(箭头所示),空表达载体没有产生该特异条带。结果证明,此融合蛋白的大小与序列推导的蛋白分子量一致,VP1 蛋白在大肠杆菌内成功表达。

对重组蛋白的质谱鉴定结果表明,该重组蛋白与登录号 Gi18766569 蛋白相匹配,可以初步确定该蛋白为蜜蜂囊状幼虫病毒的 VP1 蛋白。

3 讨论

曹兰等(2012)研究了基于 SBV 5′ 端结构基因的不同地区 SBV 分离株的序列同源性,研究结果表明,至少可以将 SBV 分成 3 个基因型,其中,辽西地区的 CSBV 与尼泊尔和中国广东地区的 CSBV 同源性更近,属于 SBV 亚洲基因型,法国、奥地利、德国与英国的 SBV 在进化关系上较近,属于 SBV 欧洲型,另一个是尼泊尔株,其在进化与 SBV 亚洲基因型、欧洲基因型均较远。Grabensteiner 等(2001)的研究也显示此病毒的 3 个尼泊尔株与欧洲型有差异,但是有 1 个尼泊尔株与欧洲型接近。由此可见,即使同一地区的不同毒株在进化上也可能存在差异(徐书法等,2011)。本实验以 VP1 结构蛋白序列为参考序列,研究了 CSBV 北京株与其他分离株间的系统进化关系,研究结果与前人基于序列 SB14-15 的进化分析结果十分相似(曹兰等,2012;罗文华等,2013),同样可以把 SBV 分成 3 个基因型,本实验所收集的 CSBV 北京分离株归为亚洲基因型。由此可见,我们利用 VP1 序列进行的 CSBV 系统进化分析与前人报道的基于 SB1-2,SB6-7,SB9-10,SB11-12 和 SB14-15 5 个片段的系统进化分析结果具有一致性(Chen *et al.*, 2004;曹兰等,2012)。

前人研究结果表明，序列替换率是与物种的遗传多样性呈正相关的（罗文华等，2013）。本实验基于 SBV 的 VP1 片段对 SBV 不同分离株间进行了序列遗传性分析，目的是通过对此区域蛋白的遗传和变异度的分析，来更好地反映 SBV 的系统进化关系及遗传多样性。本实验结果表明，东方蜜蜂亚洲基因型分离株的替换率总体低于欧洲型西方蜜蜂分离株，可见亚洲型分离株的遗传多样性比欧洲型分离株丰富。这可能是由于在亚洲既分布有东方蜜蜂又有西方蜜蜂，而在欧洲仅分布有西方蜜蜂，这种亚洲蜂种多于欧洲的蜂群种群状况，引起了囊状幼虫病毒亚洲型的替换率小于欧洲型，并由此可以进一步推测，替换率的大小是病毒对不同种类宿主的适应性进化的结果（Grabensteiner *et al*., 2001）。这与 Cheos 等（2012）的报道结果相一致。韩国西方蜜蜂分离株 AmSBV-Kor19 与 CSBV-GZ、CSBV-LN 和韩国东方蜜蜂 SBV 分离株的亲缘关系较近，说明病毒株基因组序列变化与地理起源关系更加密切，这一点又可以通过 AmSBV-Kor19 与 SBV-UK 有着不同的限制性酶切位点（*Pst* Ⅰ）得到进一步的证明，虽然同为西方蜜蜂，但是由于其所在地理位置不同，宿主选择的适应性则具有一定的差异。一个病毒的基因在不同宿主和不同地域所面临的选择压力不同，因此需要通过 *dS* 与 *dN* 的比值来探索不同地域蜜蜂囊状幼虫病毒 VP1 蛋白基因的进化特性（齐鲁等，2012）。从本实验的序列比对结果可以看出，全部候选序列的 VP1 基因的主要变异活跃位点位于第 835－904 位之间，这可能会引起病毒在致病性上存在着差异，研究结果为进一步分析 CSBV 致病性分化的分子机理提供了基础。

本研究同时发现，不同年份的 CSBV 北京分离株序列间差异较小，说明不同分离株间的差异不是由于不同年份的环境因素变化引起的，而病毒的变异受病毒对宿主的适应性影响更大，Grabensteiner 等（2001）也认为 SBV 适应宿主是引起序列间变异的内在动力。今后可以通过制备 VP1 蛋白抗体，进一步研究蜜蜂囊状幼虫病毒检测试剂用于病毒的快速检测，为今后进一步开发蜜蜂病害防治的生物制剂奠定基础。

参考文献（References）

Ai HX, Yan X, Han RC, 2011. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(6): 160－164.

Bailey L, Gibbs AJ, Woods RD, 1964. Sacbrood virus of the larval honey bee (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*, 23: 425－429.

Cao L, Shen KF, Zhang YF, Luo WH, Wang RS, Ren Q, Guo J, Wang ZD, Dai GR, 2012. Genotyping of honey bee sacbrood virus. *Progress in Veterinary Medicine*, 33(1): 41－44. [曹兰, 沈克飞, 张邑帆, 罗文华, 王瑞生, 仁勤, 郭军, 王志东, 戴国荣, 2012. 蜜蜂囊状幼虫病病毒的基因型分析. 动物医学进展, 33(1): 41－44]

Chen YP, Zhao Y, Hammond J, Hsu H, Evans J, Feldlaufer M, 2004. Multiple virus infections in the honey bee and genome divergence of honey bee viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 87(2): 84－93.

Choe SE, Nguyen LTK, Noh JH, Kweon CH, Reddy KE, Koh HB, Chang KY, Kang SW, 2012. Analysis of the complete genome sequence of two Korean sacbrood viruses in the honeybee, *Apis mellifera*. *Virology*, 432(1): 155－161.

Feng JX, Yu JX, Zhang JQ, 1999. Cloning of partial structure protein gene from Chinese sacbrood virus. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 38(5): 124－126. [冯建勋, 余键秀, 张景强, 1999. 中蜂囊状幼虫病病毒部分结构蛋白基因的克隆及序列分析. 中山大学学报(自然科学版), 38(5): 124－126]

Freiberg M, Jong DD, Message D, Cox FD, 2012. First report of sacbrood virus in honeybee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 11(3): 3310－3314.

Grabensteiner E, Bakonyi T, Ritter W, Pechhacker H, Nowotny N, 2001. Development of a multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of three viruses of the honeybee (*Apis mellifera* L.): *Acute bee paralysis virus*, *Balck queen cell virus* and *Sacbrood virus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 94(3): 222－225.

Hong IP, Woo SO, Choi YS, Han SM, Kim NS, Kim HK, Han SH, Lee MY, Lee ML, Byeon KH, 2011. Prevalence of *Nosema* and virus in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies on flowering period of Acacia in Korea. *Mycobiology*, 39(4): 317－320.

Liu XJ, Zhang Y, Yan X, Han RC, 2010. Prevention of Chinese sacbrood virus infection in *Apis cerana* using RNA interference. *Current Microbiology*, 61(5): 422－428.

Luo WH, Zhang YF, Shen KF, Cao L, Yang R, Lu Y, 2013. Genotype-specific genetic variation of sacbrood virus isolate from *Apis cerana cerana* in Chongqing region, China. *Chinese Journal of Biologicals*, 26(3): 315－323. [罗文华, 张邑帆, 沈克飞, 曹兰, 杨睿, 卢茵, 2013. 重庆地区中蜂囊状幼虫病病毒型特异性遗传变异分析. 中国生物制品学杂志, 26(3): 315－323]

Ma MX, Li M, Cheng J, Yang S, Wang SD, Li PF, 2011. Molecular and biological characterization of Chinese sacbrood virus LN isolate. *Comparative and Functional Genomics*, 6: 386－409.

Qi L, Yuan L, Wu P, Ye YP, Ding YQ, 2012. Analysis on the evolution of HPV gene. *Progress in Modern Biomedicine*, 12(34): 6607－6614. [齐鲁, 袁理, 吴萍, 冶亚平, 丁彦青, 2012. HPV 基因的进化分析. 现代生物医学进展, 12(34): 6607－6614]

Runckel C, Flenniken ML, Enfel JC, Ruby JG, Ganem D, Andino R, Derisi JL, 2011. Temporal analysis of the honeybee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, Nosema, and Crithidia. *PLoS ONE*, 6(6): e20656.

Wang GR, Wu KM, Guo YY, 2003. Cloning, expression and immunocytochemical localization of a general odorant-binding protein gene from *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(1): 115 – 124.

Xu SF, Zhou T, Hu YY, Song HL, Yang J, Luo QH, 2011. Cloning and phylogeny evolution analysis of sac brood virus gene CSBV-BJ/2010 in Chinese honey bee (*Apis cerana cerana*). *Journal of Shanghai Jiaotong University*, 29(5): 44 – 48. [徐书法, 周婷, 胡颖颖, 宋怀磊, 杨俊, 罗其花, 2011. 中华蜜蜂囊状幼虫病病毒 CSBV-BJ/2010 基因克隆及序列分析. 上海交通大学学报, 29(5): 44 – 48]

Xu YP, Zhang YQ, Li JH, Xing LP, Zhang CX, 2007. Nest-PCR detection for the honey bee sacbrood virus disease. *Bulletin of Science and Technology*, 23(6): 824 – 827. [许益鹏, 章奕卿, 李江红, 邢丽苹, 张传溪, 2007. 蜜蜂囊状幼虫病毒病的 Nest-PCR 检测. 科技通报, 23(6): 824 – 827]

Yang RJ, Dong BY, Fan RL, Guo ZQ, Li XJ, Hong T, 1988. Investigation of nucleic acids and polypeptides of Chinese sacbrood virus. *Virologica Sinica*, 1(1): 54 – 57. [杨荣鉴, 董秉义, 范瑞莲, 郭振泉, 李小杰, 洪涛, 1988. 中蜂囊状幼虫病病毒核酸和多肽的研究. 病毒学杂志, 1(1): 54 – 57]

(责任编辑: 赵利辉)